

Aus dem Hygiene-Institut
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Möglichkeiten und Grenzen der Sterilisation
mit einem Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Roland Müller-Hirth
aus
Heilbronn

Mainz, Januar 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Hygiene-Institut
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER STERILISATION
MIT EINEM ALKOHOL-ALDEHYD-GASGEMISCH

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Roland Müller-Hirth
aus
Heilbronn

Mainz, Januar 1974



Fachbereichsdekan:	Prof. Dr. U. WOLLERT
Referent:	Prof. Dr. J. BORNEFF
Korreferent:	Prof. Dr. F. SELENKA
Tag der mündlichen Prüfung:	

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DES ALKOHOL-ALDEHYD-GASGEMISCHES ALS STERILISA- TIONSVERFAHREN	7
1.	Die Empfindlichkeit verschiedener Bakterien und Pilze gegenüber dem Alkohol-Aldehyd- Gasgemisch (AAG)	7
a)	Präparationen der vegetativen Bakterien- formen	7
b)	Präparation der Bakteriensporen	7
c)	Präparation der Pilze	8
d)	Durchführung der Versuche	9
2.	Der Einfluß unterschiedlicher Keimträger und Hüllsubstanzen auf die Keimtötung von Bac. subtilis var. globigii-Sporen	12
a)	Untersuchungen des Einflusses verschiedener Keimträger	12
b)	Untersuchung des Einflusses verschiedener Hüllsubstanzen	16
3.	Untersuchungen über den Einfluß unterschiedli- cher relativer Feuchte beim Trocknen der Keim- träger	19
4.	Vergleichende Untersuchung der Eignung von Sporenerde und handelsüblichen biologischen Sterilindikatoren zur Überprüfung des Steri- lisationseffektes	26
5.	Der Einfluß unterschiedlicher Verpackung auf den Abtötungseffekt von Bac. subtilis-Sporen in Sterilindikatoren	29

6. Die Beeinflussung der Chargenzeit durch unterschiedliche Mengen Sterilisiergut	29
III. D I S K U S S I O N	33
IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG DER STERILISATION MIT DEM ALKOHOL-ALDEHYD-GASGEMISCH	42
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	44
VI. LITERATURVERZEICHNIS	46

I. EINLEITUNG

Thermische Sterilisationsverfahren können nur bei Materialien verwendet werden, die durch die hohen Temperaturen bei der Sterilisation mit trockener Hitze bzw. durch den Einfluß des gespannten und gesättigten Wasserdampfes beim Autoklavieren nicht Schaden leiden. Deshalb war es notwendig, andere Sterilisationsverfahren für hitzeempfindliche Materialien zu suchen.

PHILLIPS (23) überprüfte mit dieser Zielsetzung im Jahre 1949 in grundlegenden Untersuchungen die Möglichkeit der Anwendung von Äthylenoxid zur Sterilisation von hitzeempfindlichen Materialien. In der Folge wurden dann durch zahlreiche weitere experimentelle Untersuchungen (2, 6, 10, 11, 12, 17, 18, 27, 28, 30, 31, 34) die Möglichkeiten und Grenzen der Gassterilisation mit Äthylenoxid festgelegt. Als bedeutungsvoll erwies sich dabei, daß infolge der Explosions- und Feuergefahr sowie der Möglichkeit einer Intoxikation beim Umgang mit diesem Gas (welches zu den hochtoxischen Wirkgasen rechnet), dieses Verfahren nur besonders geschultem Personal (21) überantwortet werden darf. Darüber hinaus gibt es bei der Sterilisation mit Äthylenoxid zahlreiche Faktoren, bei deren Nichtbeachtung der erwünschte Sterilisationseffekt verhindert wird. Wie verschiedene Autoren (10, 11, 12, 34) zeigten,

sind vor allem die Konzentration des Wirkstoffes, die Einwirkungszeit, die Temperatur, die absolute und nicht nur die relative Feuchte von großer Bedeutung.

Für die Zuverlässigkeit einer Sterilisation mit Äthylenoxid sind folglich die entsprechenden Vorreinigungsarbeiten, eine sachgemäße Verpackung, die sowohl gas- als auch feuchtigkeitsdurchlässig sein muß, sowie während der Sterilisation die Beachtung der oben erwähnten Faktoren entscheidend. Ein gewisser Nachteil dieses Verfahrens ist, daß adsorbierte Reste des Gases am Sterilisationsgut zurückbleiben, die bei ungenügender Luftwaschung nach der Sterilisation oder zu kurzer Lagerung zu Haut- und Schleimhautentzündungen führen können (30). Aus diesen Gründen ist die von MAYR (21) aufgestellte Forderung, Gassterilisatoren nur von dazu eigens geschultem Personal bedienen zu lassen, wegen der beschriebenen Gefahren und der Schwierigkeiten zu unterstützen.

Beim heutigen Stand der Entwicklung kann dieses Äthylenoxid-Verfahren daher in einer ärztlichen bzw. zahnärztlichen Praxis nur bedingt empfohlen werden.

Es gilt aber nicht nur die Thermolabilität der Materialien (z. B. Weichwerden von Kunststoffen) in Rechnung zu stellen, denn außerdem können auch feinmechanische Instrumente bzw. speziell geschliffene und scharfe Instrumente durch die Sterilisation mit gesättigtem und gespanntem Wasserdampf sowie durch Heißluft infolge starker Korrosion bei oftmaliger Anwendung Schaden erleiden (14, 26). Besonders

häufig sind derartige feinmechanische und scharfe Instrumente in der zahnärztlichen Praxis zu sterilisieren (26), doch werden bis zum heutigen Tag diese Bohrer, Winkel- und Handstücke, Skalpelle etc. vor allem in Einzelpraxen infolge fehlender Möglichkeiten überhaupt nicht in dem zu fordernden Ausmaß behandelt (4, 26, 33).

Die Untersuchungen von HABERMAN (14) machten deutlich, daß die zu Recht gefürchtete Korrosion bei bestimmten Metallinstrumenten im besonderen Maß durch Wasserdampf entsteht. Es ist daher verständlich, daß nach anderen Verfahren gesucht wurde. Bei einer seit einigen Jahren in den Vereinigten Staaten von Amerika verwendeten Methode gelang es in der Tat, diese Schädigung der oft kostbaren feinmechanischen Instrumente durch Anwendung eines Alkohol-Aldehyd-Wasser-Gemisches in Gasform zur Sterilisation weitgehend auszuschalten (8, 14, 16, 24).

Für dieses Verfahren verwendet man einen druckdichten Behälter in einem Tischgerät^{+) (siehe Abb. 1) mit einem Innenraum von 5.623 ccm. Das Sterilisiergut wird in eine Metallwanne gelegt und in diesen Behälter eingeschoben. Vor der Sterilisation muß der Innenraum auf eine Temperatur von $141^{\circ} \text{C} \pm 10^{\circ} \text{C}$ aufgeheizt werden, wofür etwa 15 Minuten notwendig sind. Das Erreichen dieser Temperatur ist durch das Erlöschen der unteren Signallampe zu ersehen (in Abb. 1 gekennzeichnet durch "Heating").}

^{+) Wir danken der Firma MICRO-MEGA, Bad Homburg, für die freundliche Überlassung von Versuchsg Geräten.}

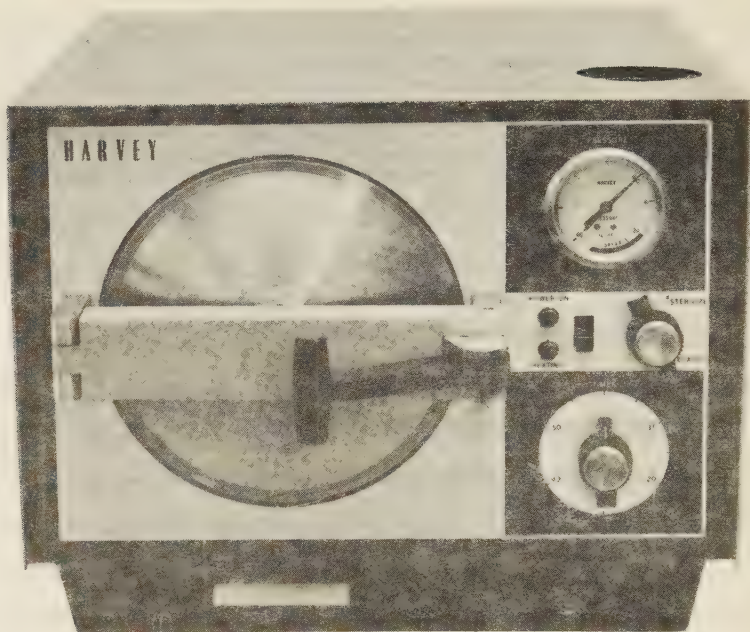


Abb. 1: Tischgerät für die Sterilisation mit Alkohol-Aldehyd-Dampf-Gemisch

Erst dann darf das Sterilisiergut in die Wanne eingeschoben werden. Anschließend wird die Sterilisationslösung ("VAPOSTERIL") durch Betätigung des Drehschalters von "Exhaust" nach "Sterilize" aus dem Vorratsbehälter (auf der Oberseite des Gerätes) in einer Menge von 15 ml pro Sterilisation in den Beschickungsraum eingelassen. Die Sterilisationslösung besteht aus:

Äthylalkohol	Methyl-Äthylketon
Isopropylalkohol	tert. Butylalkohol
Methylalkohol	Formaldehyd und
Aceton	9,252 % Aqua dest.

Nach Erreichen eines Druckes von 20 lbs (= 20 pounds per square inch, erkennbar durch entsprechende Manometeranzeige) beginnt laut Betriebsanleitung die eigentliche Sterilisationszeit. Die an einer Zeituhr einstellbare Chargenzeit beträgt laut Hersteller 20 - 35 Minuten. Nach ihrer Beendigung wird das Wirkgas durch Drehen des Schalters von "Sterilize" auf "Exhaust" abgelassen, infolge Durchströmens einer Kühlspirale auf der Rückseite des Gerätes kondensiert und in einem Behälter am Boden des Gerätes aufgefangen. Die Konstruktion des Sicherheitsverschlusses gestattet das Öffnen des Gerätes erst nach Erreichen des Atmosphärendruckes.

Der Sterilisationseffekt konnte in zahlreichen Untersuchungen bewiesen werden (7, 8, 9, 13, 14, 16, 20, 22, 24, 25, 32), wobei gleichzeitig die weit geringere Korrosion im Vergleich zur Anwendung des gespannten, gesättigten Dampfes (9, 14, 32) herausgestellt wurde.

Eingeschlossen waren auch Ermittlungen zur Abtötung von *Bacillus subtilis*-Sporen-Präparationen, wie sie in den USA zur Überprüfung des Sterilisationseffektes verwendet werden und die Sterilisation kontaminierten zahnärztlichen Instrumentariums.

In den genannten Untersuchungen sind jedoch keine Grundlagen für die Berechtigung derartiger Methoden erarbeitet worden, d. h. es wurde nicht untersucht, ob bei diesem Verfahren *Bacillus subtilis*-Sporen tatsächlich die resistente Keimspezies darstellen und somit zur Überprüfung des

Sterilisationseffektes geeignet sind. Weiter wurden wichtig Faktoren, wie z. B. der Einfluß unterschiedlicher Kontamination, der Einfluß der vorherigen Antrocknung sowie die Resistenzveränderung durch verschiedene Keimträger nicht untersucht.

Wir hielten es deshalb bei der grundsätzlichen Bedeutung eines nichtkorrosiven Verfahrens für angezeigt, in einer Studie die Resistenz verschiedener Keimspezies gegenüber diesem Verfahren sowie den Einfluß unterschiedlicher Keimträger und der unterschiedlichen Austrocknung auf die Abtötungskinetik innerhalb des Sterilisationsverfahrens zu überprüfen. Zusätzlich wurden weitere Faktoren, die für die praktische Durchführung von Bedeutung sind (z. B. Eignung von Sterilisationstüten als Verpackungsmaterial, Einfluß unterschiedlicher Mengen Sterilisiergutes) untersucht.

II. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DES ALKOHOL-ALDEHYD-GASGEMISCHES ALS STERILISATIONS- VERFAHREN

Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden bei gleicher Gaskonzentration durchgeführt. Bei allen Studien wurden unterschiedliche Einwirkungszeiten getestet.

1. Die Empfindlichkeit verschiedener Bakterien und Pilze gegenüber dem Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch (AAG)

a) Präparationen der vegetativen Bakterienformen

Sämtliche vegetativen Bakterienformen wurden nach drei 24-stündigen Passagen auf geeigneten festen Nährböden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (CSL) der Firma OXOID überimpft, die wir nach einer aeroben Bebrütung durch 16 Stunden bei 37° C verwendeten. Die Keimzahlen lagen, wie nachfolgende Zählungen ergaben, zwischen 6×10^8 und 3×10^9 Keime/ml.

b) Präparation der Bakteriensporen

Bacillus subtilis- und Bacillus cereus-Sporen präparierten wir auf folgende Weise: Die Keime wurden nach 7-tägiger Inkubation bei 37° C in CSL zur Verstärkung der Versporung mit einem Zusatz von 0,03 g Mangan-

sulfat/Liter gewonnen. Wie die mikroskopische Untersuchung ergab, waren nach dieser Inkubation ca. 98 % der Keime versport. Die Gesamtkeimzahl betrug 1×10^9 Keime/ml. Von einer Abtötung der vegetativen Formen durch kurzfristiges Erhitzen nahmen wir für diese Untersuchung Abstand, um das Nährmedium nicht zu verändern, auch verzichteten wir auf vorherige Waschung, um die Sporen in ihrer Resistenz nicht zu beeinflussen.

Die Präparation von Milzbrandsporen erfolgte auf ähnliche Weise. Die Keime wurden hier auf fünfprozentigem Hammelblutagar kultiviert und anschließend in CSL eingebracht. Alle Keimsuspensionen homogenisierten wir mittels Glaskugeln auf einem Magnetrührer.

Clostridien-Sporen wurden durch anaerobe Kultur der Keime auf fünfprozentigem Hammelblutagar und nachfolgendem Aufbewahren einer davon in CSL hergestellten Keimsuspension bei 22°C durch 7 Tage gewonnen.

c) Präparation der Pilze

Nach Züchtung von *Candida albicans* durch 3 Tage bei 28°C auf SABOURAUD-Agar war die weitere Behandlung mit der bei den vegetativen Bakterienformen beschriebenen identisch. Chlamydosporen dieser Spezies wurden durch einwöchige Kulturen auf Maismehlagar in einer feuchten Kammer bei 22°C und Abschwemmen der Kulturen

mit CSL nach vorheriger mikroskopischer Kontrolle gewonnen. Diese Suspensionen homogenisierten wir für die Untersuchung ebenfalls mit Glaskugeln auf einem Magnetprüher.

Trichophyton mentagrophytes, *Saccharomyces cerevisiae* und *Microsporum gypseum* wurden auf SABOURAUD-Agar bei 22° C durch 7 Tage kultiviert und die nachfolgende Behandlung wie bei den vegetativen Bakterienformen durchgeführt.

Bei diesem Versuch entschieden wir uns für die Verwendung von CSL, um damit - wie Untersuchungen von BORNEFF (5) gezeigt hatten - optimale Überlebensraten in angetrocknetem Zustand zu ermöglichen. Gleichzeitig sollte dadurch eine in der Praxis vorkommende organische Verunreinigung simuliert werden.

d) Durchführung der Versuche

Als Keimträger dienten 1 cm² große, sterilisierte Batistlappchen, die mittels Marburg-Pipetten mit 0,01 ml der oben beschriebenen Keimsuspension kontaminiert und in offenen Petrischalen durch 30 Minuten bei 37° C und einer relativen Feuchte von 25 % getrocknet wurden.

Für die Versuche exponierten wir diese Keimträger anschließend während unterschiedlicher Zeiten im Sterilisator. Sofort nach den entsprechenden Einwir-

kungszeiten wurden die Keimträger mit vegetativen Bakterienformen bzw. aeroben Sporenbildnern zur Rückkultur in CSL eingebracht. Eine Enthemmung etwaiger Gasreste erschien aufgrund vorher durchgeführter Diffusionsteste auf Nähragar nicht notwendig. Für die anaeroben Sporenbildner wurde Thioglykolat-Bouillon und für Pilze SABOURAUD-Bouillon verwendet. Alle Kulturen - außer bei den Pilzen - wurden nach 5-tägiger Bebrütung bei 37° C beurteilt. Die Subkulturen von *Bacillus stearothermophilus* inkubierten wir bei 50° C. Die Ergebnisse der bei 28° C bebrüteten Pilzkulturen wurden nach 8 Tagen abgelesen.

Um Kontaminationen auszuschließen, übertrugen wir alle bewachsenen Subkulturen auf feste Nährböden und identifizierten die Keime in diesen Kulturen.

In den Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse dieser Versuche wiedergegeben. In den Tests, bei denen jeweils die Einwirkungszeiten variiert wurden, jedoch der Druck, die Temperatur sowie das Gasgemisch konstant blieben, konnten teilweise starke Unterschiede in der Empfindlichkeit der Teststämme gegenüber dem Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, daß bei den Versuchen die Gegebenheiten der Praxis, d. h. Schutz der Mikroorganismen durch organische Hüllsubstanzen, berücksichtigt wurden.

Auffällig ist hier die besonders hohe Resistenz der bakteriellen Sporen (Tab. 1) im Vergleich zur Widerstandsfähigkeit der übrigen getesteten Bakterien und Pilze. Ein Vergleich der einzelnen Arten aerob wachsender Sporenbildner zeigt, daß *Bac. subtilis variatio globigii* ATCC 6633 die höchste Resistenz besitzt, gefolgt von *Bac. subtilis* ATCC 6051 und *Bac. anthracis*. Die Sporen von *Bac. stearothermophilus*, die bekanntlich eine besonders hohe Thermoresistenz besitzen, erwiesen sich dagegen bezüglich des Alkohol-Aldehyd-Gasgemisches als empfindlicher.

Besonders beachtenswert ist auch die hohe Resistenz der *Clostridium perfringens*-Sporen, die aufgrund dieser Ergebnisse eine annähernd gleiche Resistenz wie die Sporen von *Bac. subtilis variatio globigii* ATC 6633 zeigen.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, waren bei den grampositiven Kokken von den vier getesteten Stämmen von *Streptococcus faecalis* drei nach einer Expositionszeit von 25 Sekunden und von den getesteten Staphylokokken-Stämmen nur zwei nach derselben Expositionszeit subkultivierbar. Von den eingesetzten gramnegativen Stämmen scheinen nach diesen Ergebnissen *Proteus mirabilis* und vor allem *Klebsiella pneumoniae* am resistentesten zu sein. Bei den *Klebsiella pneumoniae*-Stämmen waren nach einer Expositionszeit von 25 Sekunden bei Stamm Nr 29 keine Mikroorganismen mehr kultivierbar - bei Stamm Nr. 27 nur in einem der drei Subkulturröhrchen; Stamm Nr. 28 überlebte jedoch in allen drei Ansätzen

noch nach einer Expositionszeit von 45 Sekunden.

Die Subkulturen der getesteten Pilzarten sowie der Chlamydo-Sporen von *Candida-albicans* zeigten nach einer Expositionszeit von 25 Sekunden kein Wachstum mehr.

Die in Frage gestellte Eignung von *Bacillus subtilis*-Sporen hat sich damit bestätigt.

2. Der Einfluß unterschiedlicher Keimträger und Hüllsubstanzen auf die Keimabtötung von *Bac. subtilis* var. *globigii*-Sporen

Da sich aufgrund der oben beschriebenen Versuche der Stamm *Bac. subtilis* variatio *globigii* ATCC 6633 (Tab. 1) als besonders resistent erwiesen hatte, wurde für die Erarbeitung der Abtötungskurven in den weiteren Tests ausschließlich dieser Stamm verwendet

a) Untersuchungen des Einflusses verschiedener Keimträger

Für die folgenden Versuche modifizierten wir zur Präparation der Sporen eine von BEEBY und WHITEHOUSE (2) angegebene Methode.

Die Züchtung des *Bac. subtilis* ATCC 6633 erfolgte hierzu auf folgendem Agar:

Nährbouillon (OXOID)	6,00 g
MnSO ₄ - H ₂ O	0,03 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
Agar (OXOID)	12,00 g
Aqua dest.	ad 1.000 ml

Nach achttägiger aerober Bebrütung bei 37° C wurden die Keime mittels Glasspatel geerntet, durch Glaswolle filtriert und anschließend sechsmal mit Aqua dest. gewaschen. In dem davon gewonnenen Sediment töteten wir durch 10 Minuten langes Erhitzen bei 85° C im Wasserbad die vegetativen Formen ab und schlossen erneut dreimaliges Waschen mit Aqua dest an. Hierauf wurde die Sporensuspension derart eingestellt, daß eine Keimzahl von 10⁸ Sporen/ml resultierte. Die Kontrolle dieser Keimzahl erfolgte durch Subkultur auf Blutagarplatten. Von dem derart präparierten Ausgangsmaterial wurden je 0,01 ml mittels Marburg Pipetten auf kleine, etwa 5 x 20 mm große entfettete Glasstückchen, ferner auf Filterpapierstückchen (SELECTAN Nr. 1506) und Batistläppchen aufgebracht. Alle Keimträger wurden durch 16 Stunden bei einer relativen Luftfeuchte von 25 % bei 37° C in offenen Petrischalen getrocknet. Die auf diese Weise getrockneten Keimträger sterilisierten wir während unterschiedlicher Zeiten offen im HARVEY-Sterilisator. Nach den jeweiligen Einwirkungszeiten wurde jeder Keimträger sofort

anschließend in Röhrchen mit 10 ml 0,6% und 3 % Tween 80, 0,5 % Lecithin und 0,1 % Histidin gegeben, wobei diese Zusätze zur Verbesserung der Aufschließung von Zellkonglomeraten dienten. Außerdem enthielten die Röhrchen zusätzlich einige Glaskugeln.

Für Koloniezählbestimmung der überlebenden *Bac. subtilis*-Sporen wurden die demart beschickten Röhrchen über 5 Minuten auf einem Rüttler geschüttelt und Verdünnungsreihen in physiologischer Kochsalzlösung angelegt. Die wir - wie auch die Ausgangslösung - in Mengen von jeweils 0,1 und 1,0 ml auf Blutagarplatten mittels steriler Glaskugeln ausgesparten. Die Zehrung der Oberflächenkulturen sowie die der Ausgangsbouillone erfolgte aerob durch 48 Stunden bei 37° C. Hierauf wurden die gewachsenen Kolonien von *Bac. subtilis* gezählt und zusätzlich die Ausgangskulturen auf Wachstum geprüft. Die gezählten Röhrchen sukzessivierten wir zur Identifizierung der Testkeime.

Alle Versuche wurden bei denselben Prüfzeiten mindestens zweimal reproduziert. Die bei diesen Untersuchungen erarbeiteten Absterbekurven wurden aus den Werten dreier Einzeluntersuchungen ermittelt.

Für Beurteilung des Einflusses unterschiedlicher Keimträger auf die Absterbung wurden Filterpapier, Glas und Kunststoffplatten verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

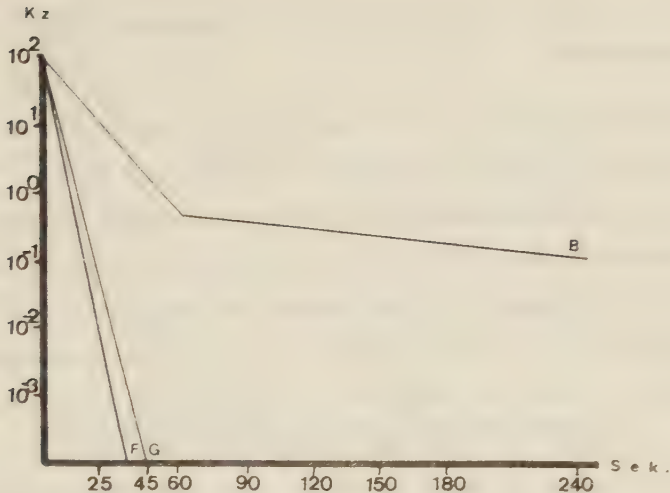


Abb. 2: Abtötungskurve von *Bacillus subtilis* Sporen-Suspensionen in Aqua dest., angetrocknet auf verschiedenen Keimträgern bei einer relativen Feuchte von 25 %.

Auf der Ordinate sind jeweils die Prozentzahlen der Rückgewinnungsraten aufgetragen.

F = Filter, G = Glas, B = Batistlappchen

Danach ist es weit schwieriger, Mikroorganismen angetrocknet auf Batistlappchen abzutöten als dies bei Verwendung von Filterpapier und Glas als Keimträger der Fall ist. Der Abtötungseffekt bei Verwendung von Filterpapier und Glas ist etwa gleich stark. Diese Ergebnisse gelten jedoch nur für die Antrocknung von *Bac. subtilis*-Sporen in Aqua dest. bei einer relativen Feuchte von 25 %.

b) Untersuchung des Einflusses verschiedener Hüllsubstanzen

Für diese Untersuchung wurden die Kulturen von *Bac. subtilis variatio globigii* ATCC 6633 wie unter Punkt a) hergestellt. Das nach der letzten Waschung gewonnene Sediment suspendierten wir einerseits in physiologischer Kochsalzlösung und andererseits in Aqua dest. mit einem Zusatz von 20 % inaktiviertem Rinderserum. Die Suspensionen wurden auf eine Keimzahl von 10^8 /ml eingestellt und nach der oben beschriebenen Weise (Punkt a)) auf die verschiedenen Keimträger aufgebracht. Auch hier erfolgte die Trocknung der Keimträger durch 16 Stunden bei 37° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 25 %. Hierauf wurden die Keimträger wie bei den oben erwähnten Versuchen während unterschiedlicher Zeiten im Sterilisator exponiert und sofort darauf der Gehalt an kultivierbaren Sporen bestimmt.

Auch diese Versuche wurden bei denselben Zeiten mindestens zweimal vollständig reproduziert.

Wie aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen hervorgeht (Abb. 3 und 4), waren bei Verwendung von Kochsalzlösung die Sporen auf Batistläppchen und Glas geringgradig empfindlicher als bei Präparationen der Keimsuspension mit 20 %-igem Serum. Bei den Präparationen

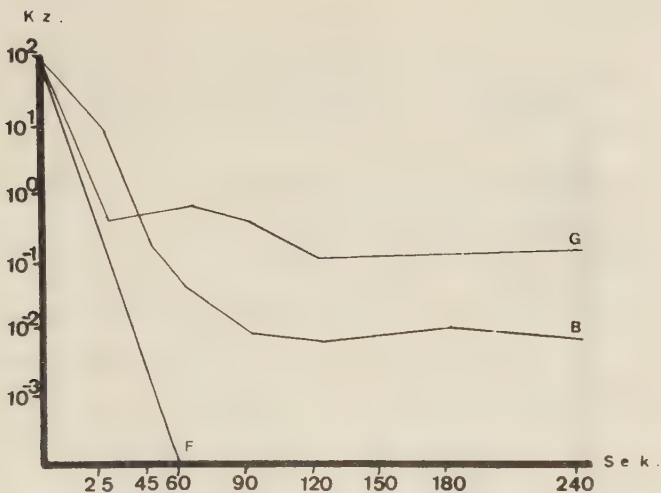


Abb. 3: Abtötungskurve von *Bacillus subtilis* Sporensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung, angetrocknet auf verschiedenen Keimträgern bei einer relativen Feuchte von 25 %.
F = Filter, G = Glas, B = Batistläppchen

mit Kochsalzlösung waren die Keime auf den Batistläppchen leichter abzutöten als auf den Glasträgern, während bei Eiweißbelastung der Effekt umgekehrt festzustellen war.

An den beiden Kurvenverläufen ist auch noch bemerkenswert, daß bei Glas und Batist in der Keimsuspension mit Kochsalzlösung nach anfänglichem Abfall während der ersten 60 - 90 Sekunden sich in der Folge ein annähernd horizontaler Verlauf einstellte, daß aber bei Präparation mit Eiweiß diese Kurven im gesamten Verlauf eine fallende Tendenz zeigten. Hingegen war unter der-

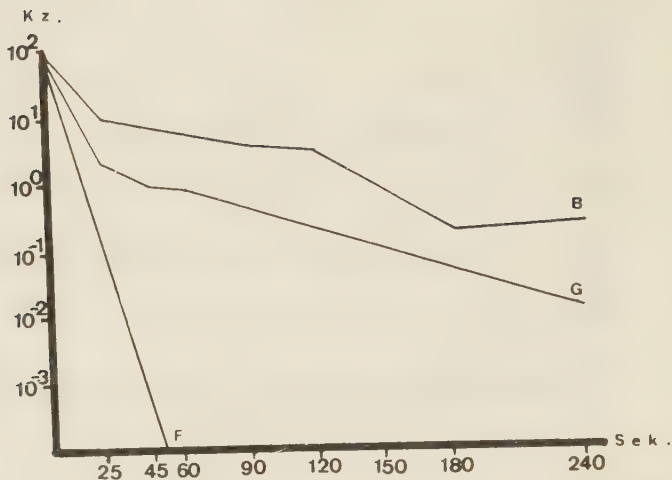


Abb. 4: Abtötungskurven von *Bacillus subtilis*-Sporen-Suspensionen in Aqua dest. und 20 % Serum, angetrocknet auf verschiedenen Keimträgern bei einer relativen Feuchte von 25 %.

F = Filter, G = Glas, B = Batistlappchen

selben Präparation bei Filterpapier als Keimträger eine rasche Abtötungskurve festzustellen.

Untersuchungen über den Einfluß unterschiedlicher relativer Feuchte beim Trocknen der Keimträger

Drei verschiedene Keimträger (Glas, Filterpapier, Batistläppchen) wurden mit Sporensuspensionen von *Bac. subtilis variatio globigii* ATCC 6633 nach den unterschiedlichen Präparationsweisen, also mit Aqua dest., physiologischer Kochsalzlösung und Aqua dest. mit einem Endgehalt von 20 % Serum, bei unterschiedlicher Feuchte (6 %, 25 %, 98 %) und einer Temperatur von 37° C über 48 Stunden angetrocknet. Eine Feuchtigkeit von 98 % ließ sich im Exsiccator mittels Kaliumbichromat (107 g/Liter Aqua dest.) unter Vakuum herstellen. 6 % erhielten wir im Exsiccator mit Hilfe von gekörntem Calciumchlorid.

Auch diese, auf verschiedene Weise angetrockneten Keimträger wurden im Sterilisator während unterschiedlicher Zeiten exponiert. Die Keimzahlbestimmung der kultivierbaren Sporen erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Die Versuche wurden mindestens zweimal in Einzelsätzen reproduziert. Bei diesen Untersuchungen wurde die Abtötungskinetik von *Bac. subtilis*-Sporen in Aqua dest. (Abb. 5a-c), in physiologischer Kochsalzlösung (Abb. 6a-c) und in 20 %-iger Serumlösung (Abb. 7a-c) auf den drei verschiedenen Keimträgern untersucht, wobei jeweils der Einfluß unterschiedlicher relativer Feuchte bei der Antrocknung bei 37° C zu beurteilen war (rel. Feuchte 6% = 5a, 6a, 7a; 25% = 5b, 6b, 7b; 98% = 5c, 6c, 7c).

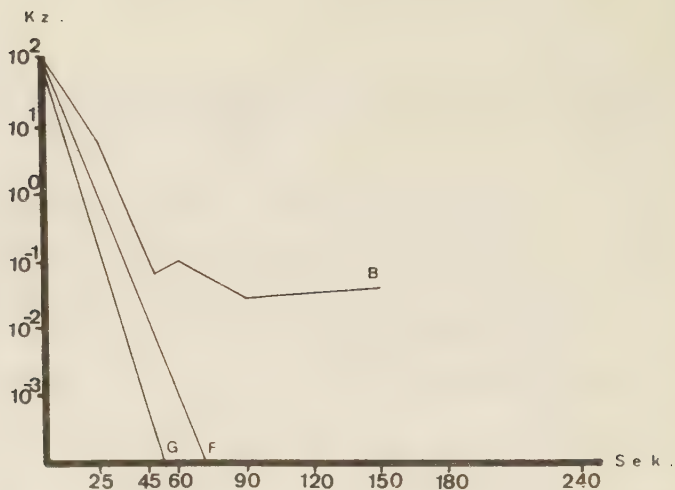


Abb. 5: Abtötungskurven nach Antrocknung bei unterschiedlicher relativer Feuchte, nach Präparation der Sporensuspension in Aqua dest.;

F = Filter, G = Glas, B = Batistläppchen

a) relative Feuchte 6 %

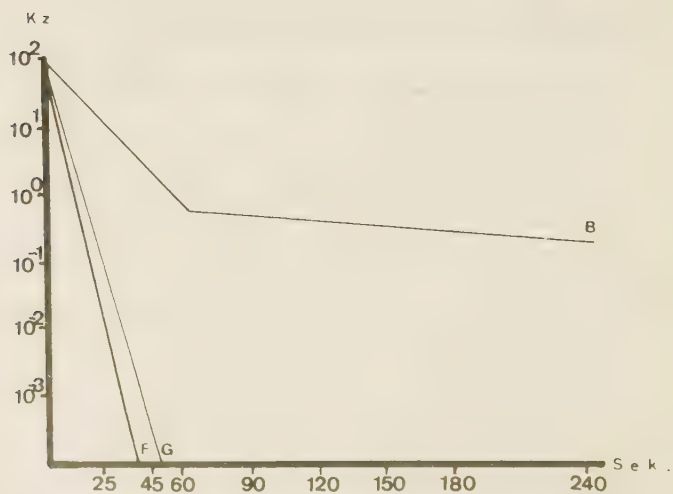


Abb. 5 b): relative Feuchte 25 %

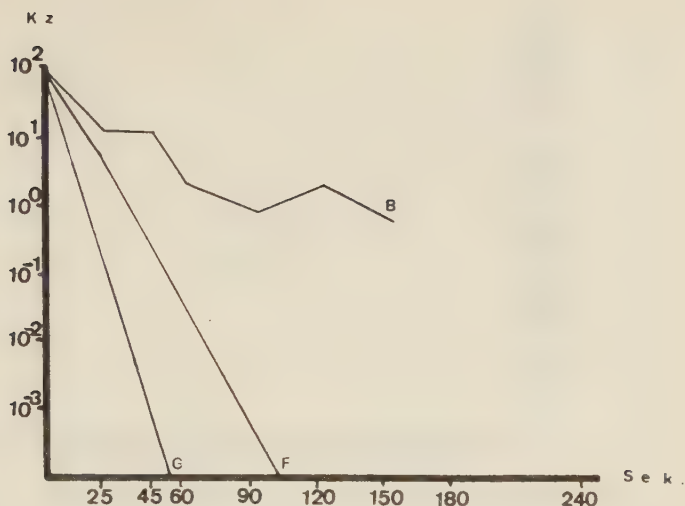


Abb. 5 c): relative Feuchte 98 %

Wie aus Abb. 5a - c ersichtlich ist, waren bei der Antrocknung der Keime in Aqua dest. die Keime auf den Bastisläppchen im Vergleich zu denen auf den übrigen Keimträgern am resistentersten. Die Unterschiede bei Verwendung von Filterpapier und Glas als Keimträger traten dagegen kaum in Erscheinung. Ein Vergleich der Abtötungskurven zwischen den unterschiedlichen Feuchtigkeitsbedingungen bei der Antrocknung bewirkt, daß die Keime um so resistenter sind, je höher die relative Feuchte gewählt wurde.

Bei der Präparation der Keimsuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung (Abb. 6a-c) zeigte sich, daß die auf Glas fixierten Keimsuspensionen nach Antrocknung bei relativer Feuchte von 6 % und 25 % resistenter waren

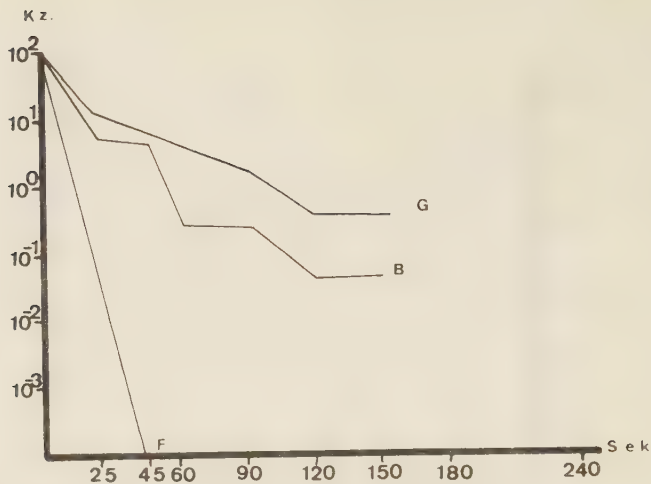


Abb. 6: Abtötungskurven nach Antrocknung bei unterschiedlicher relativer Feuchte, nach Präparation der Sporensuspension in physiologischer Kochsalzlösung;

F = Filter, G = Glas, B = Batistläppchen

a) relative Feuchte 6 %

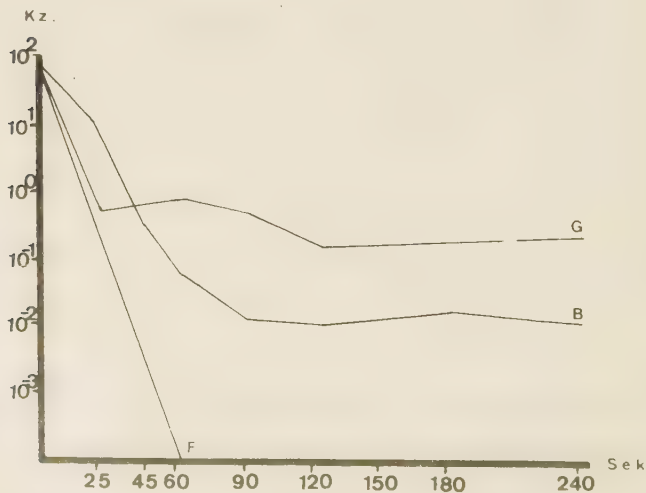


Abb. 6 b) relative Feuchte 25 %

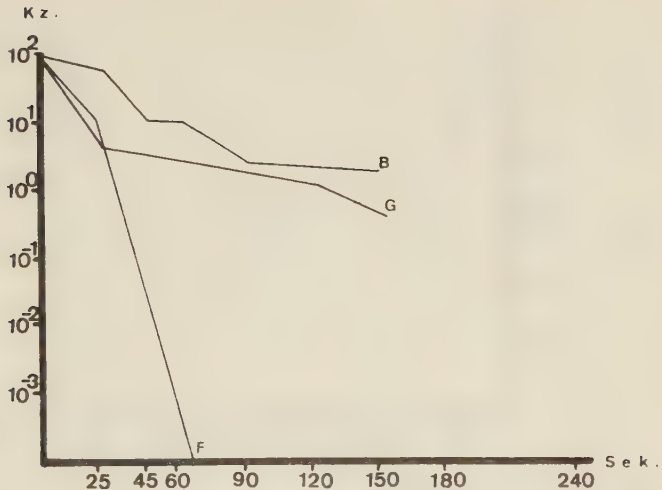


Abb. 6 c) relative Feuchte 98 %

als auf Batistlappchen. Bei der Antrocknung bei 98 %-iger relativer Feuchte sind die auf diesen beiden Keimträgern angetrockneten Keime von annähernd gleicher Resistenz (Abb. 6c). Die auf Filterpapier befindlichen Keime sind am empfindlichsten gegenüber dem Gasgemisch; jedoch zeigt sich, daß mit zunehmender relativer Feuchte bei der Antrocknung die Keime resistenter werden.

Werden die Keime in 20 %-iger Serum-Lösung angetrocknet (Abb. 7a-c), so stellt sich heraus - ähnlich wie bei der Präparation mit Aqua dest. -, daß die Keime auf den Batistlappchen am resistentersten sind. Auch hier ist die Zunahme der Resistenz auf allen drei untersuchten Keimträgern bei steigender relativer Feuchte auffällig.

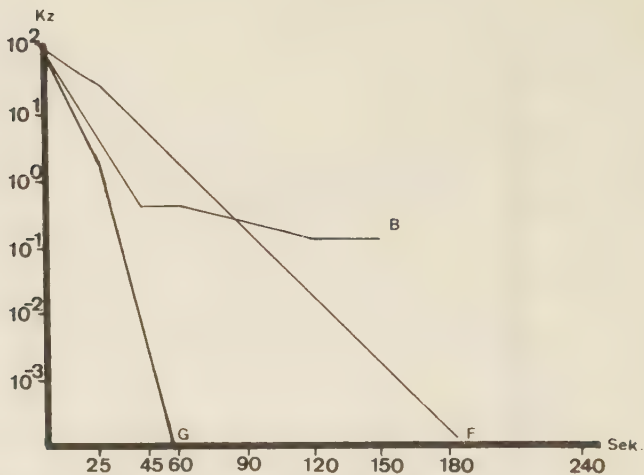


Abb. 7: Abtötungskurven nach Antrocknung bei unterschiedlicher relativer Feuchte, nach Präparation der Sporensuspension in 20 % Serumlösung; F = Filter, G = Glas, B = Batistläppchen

a) relative Feuchte 6 %

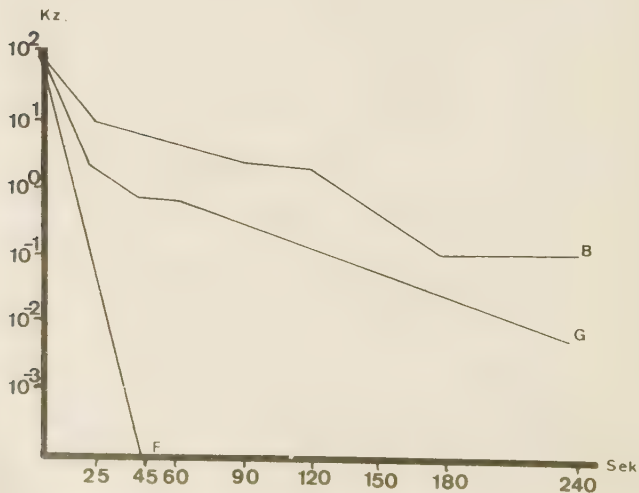


Abb. 7 b) relative Feuchte 25 %

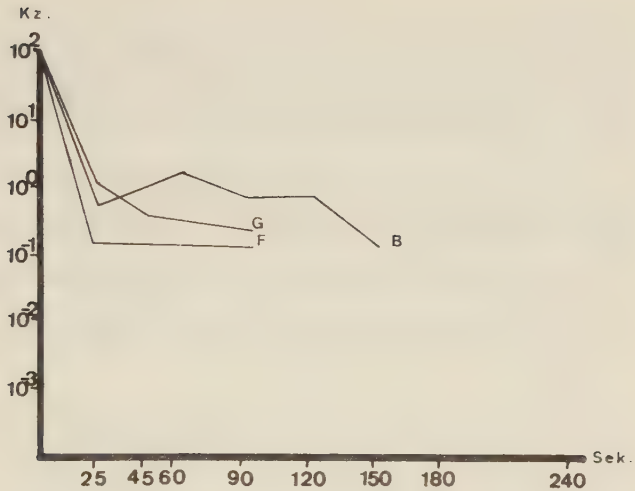


Abb. 7 c) relative Feuchte 98 %

Von besonders hoher Widerstandsfähigkeit (Abb. 7c) sind die Mikroorganismen, wenn sie bei 98 % relativer Feuchte angetrocknet werden. Ein Vergleich zwischen den Abbildungen 6c und 7c zeigt, daß die Keime in Serum auf Filterpapier schwerer abzutöten sind als in Kochsalzlösung.

Aus einem Überblick über die Abbildungen 5a-c bis 7a-c ist ersichtlich, daß bei Präparationen, die zu einer höheren Keimresistenz führen, Kurvenbilder resultieren, welche nach einem anfänglich steilen Verlauf weiterhin flacher werden.

4. Vergleichende Untersuchung der Eignung von Sporenerde und handelsüblichen biologischen Sterilindikatoren zur Überprüfung des Sterilisationseffektes

Da in den meisten Staaten Europas Sporenerde zur Überprüfung des Sterilisationseffektes von Heißluftsterilisatoren und Autoklaven verwendet wird, untersuchten wir auch die Abtötung von nativen Erdsportoren in Erde durch dieses Verfahren.

Für diese Überprüfung wurden nach der DIN-Norm 58947 hergestellte Sporenerde-Päckchen eingesetzt. Die dafür verwendete Sporenerde hatte eine vorher überprüfte Thermoresistenz bei 121° C in feuchter Hitze von 5 Minuten.

Vergleichend untersuchten wir den Abtötungseffekt des Verfahrens auf handelsübliche Sporenpräparationen, nämlich ATTEST- und SPORDI-Indikatoren.

(Bei dem ATTEST-Indikator (Minnesota Mining and Manufacturing Company, St. Paul, Minnesota 55101, USA) handelt es sich um einen Filterpapierstreifen, welcher mit *Bac. stearothermophilus*-Sporen kontaminiert ist. Der Streifen befindet sich in einer Plastikhülle, welche mit einem Filterpapier verschlossen ist. In der Plastikhülle liegt zusätzlich eine Glasphiole mit violetterm, flüssigem Nährmedium (CSL und Farbindikator). Nach der Sterilisation wird die Glasphiole durch Zusammendrücken der Plastikhülle von außen zerstört, so daß das Nährmedium zu dem mit Sporen imprägnierten Filterpapier gelangt. Anschließend werden diese Indikatoren bei 56° C im Wasserbad durch 48 Stunden inkubiert. Das Wachstum

der Testkeime ist an einem Umschlag des Farbindikators von Violett auf Gelb zu erkennen.

SPORDI-Indikatoren (American Sterilizer Company, Erie, Pennsylvania 16512, USA) beinhalten in Zellophansäckchen Filterpapierstreifen, die mit Sporen von *Bac. subtilis variatio globigii* und *Bac. stearothermophilus* kontaminiert sind. Nach der Sterilisation werden diese Filterpapierstreifen zum Nachweis von *Bac. subtilis* bei 37° C zum Nachweis von *Bac. stearothermophilus* bei 55° C in CSL durch sieben Tage kultiviert.)

Je ein Sporenerdepäckchen, ein ATTEST- und ein SPORDI-Indikator wurden während unterschiedlicher Zeiten ohne zusätzliche Beschickung, d. h. im leeren Sterilisator exponiert.

Anschließend kam die Erde direkt in Thioglykolat-Bouillon und CSL, um eine eventuelle Hemmung des Wachstums durch Gasreste im Filterpapier auszuschließen. Die Subkulturen wurden durch 14 Tage aerob bei 37° C bebrütet. Die Kultur von ATTEST- und SPORDI-Indikatoren erfolgte nach der beschriebenen Vorschrift. Auch diese Versuche wurden zweimal reproduziert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Wie daraus ersichtlich ist, waren nach einer Expositionszeit von 7 Minuten in den Subkulturen keine lebenden Testkeime in jedem der drei biologischen Prüfmaterialien nachweisbar. Somit konnte auch mit den Sporenerdepäckchen ein Sterilisationseffekt bei leerem Gerät nachgewiesen werden. Bei einem Vergleich der Subkultur von *Bac. stearothermophilus* unter Verwendung

der beiden handelsüblichen Sporenpräparationen zeigt sich, daß diese im ATTEST-Indikator eine weit höhere Resistenz besitzen.

Wie aus Abbildung 8 erkennbar ist, wird die Geschwindigkeit der Keimabtötung wesentlich durch die Art der Verpackung beeinflusst. Frei im Gerät exponierte Sterilindikatoren sind leichter sterilisierbar, als wenn sie in Zellophansäckchen oder in Zellophansäckchen und Papiertüten verpackt sind.

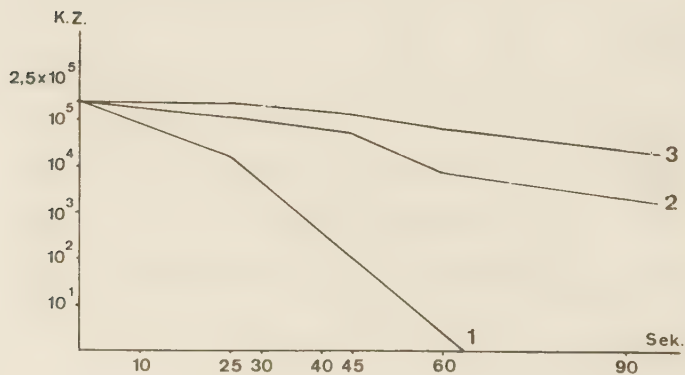


Abb. 8: Verlauf der Keimabtötungskurven von *Bac. subtilis* Sporen in SPORDI-Indikatoren
1 = frei, 2 = in Zellophansäckchen,
3 = in Zellophansäckchen und Papiertüten

5. Der Einfluß unterschiedlicher Verpackung auf den Abtötungseffekt von Bac. subtilis-Sporen in Sterilindikatoren

SPORDI-Indikatoren wurden frei und in zwei verschiedenen Verpackungen (Zellophansäckchen bzw. Papiertüten) im Sterilisator durch unterschiedliche Zeiten exponiert. Nach der Exposition erfolgte die Kontrolle der Keimträger auf ihren Testkeimgehalt nach der oben beschriebenen Methode (2a).

6. Die Beeinflussung der Chargenzeit durch unterschiedliche Mengen Sterilisiergut

Nachdem in den vorhergegangenen Versuchen die Einflüsse von unterschiedlicher relativer Feuchte bei der Antrocknung, der Wirkung unterschiedlicher Hüllsubstanzen und unterschiedlicher Trägermaterialien sowie der verschiedenen Verpackungen festgestellt worden war, wurde zusätzlich in einem praxisnahen Versuch der Einfluß unterschiedlicher Mengen von eingelegtem Sterilisiergut überprüft. Wir kontrollierten den Betriebsablauf bei leerem Gerät sowie bei Beschickung mit 500 g, 1.000 g und 2.000 g an zahnärztlichen Instrumenten. In Tabelle 3 sind die Instrumente, die bei diesen Beschickungen gewählt wurden, aufgeführt.

Tab. 3: Art der Instrumente bei den unterschiedlichen
Beschickungen

500 g	1.000 g	2.000 g
4 Mundspiegel	7 Mundspiegel	20 Mundspiegel
4 Sonden	7 Pinzetten	19 Pinzetten
4 Pinzetten	7 Häkchen	8 Sonden
4 chirurg.Scheren	8 Sonden	8 Häkchen
2 Häkchen	6 chirurg.Scheren	13 chirurg.Scheren
2 Handstücke	5 Handstücke	10 Handstücke

Bei jedem Testverlauf wurden die Instrumente in insgesamt vier Papiertüten eingepackt und zusätzlich in je zwei dieser Papiertüten ein Sterilindikator (ATTEST) und ein Maximalthermometer beigegeben. Diese Messungen erfolgten bei unterschiedlich langen Einwirkungszeiten, außerdem wurde jeweils die Zeitdauer bis zum Erreichen des gewünschten Betriebsdruckes von 1,406 atü (= 20 lbs.) ab dem Einlassen des Gases gemessen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Wie auch bei anderen Sterilisationsverfahren wird die Chargenzeit (Zeitspanne für den vollständigen Ablauf der Sterilisation vom Einbringen des Sterilisiergutes bis zur Entnahme aus dem Sterilisator) durch unterschiedliche Mengen von Sterilisiergut ganz wesentlich beeinflusst. Während bei leerem Gerät 25 - 35 Sekunden bis zum Erreichen des gewünschten Betriebsdruckes von 1,406 atü (= 20 lbs) verstreichen, beträgt dieser Zeitraum bei Beschickung mit 1.000 g kalten metallischen Instrumenten 10 - 12 Minuten, bei 2.000 g 18 Minuten. Da aufgrund der Ergebnisse obiger Versuche (Tab. 5) sich die ATTEST-Indikatoren als gleichwertig mit Sporenerde erwiesen haben, wurden für diese Versuche die ATTEST-Indikatoren zur Überprüfung des Sterilisationseffektes eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß bei leerem Gerät die Indikatoren nach einer Chargenzeit von 10 Minuten steril waren, während bei Beschickung mit 1.000 g Metallinstrumenten Sterilität erst nach 22,5 Minuten erzielt wurde. Die gleichzeitig durchgeführten Temperaturmessungen mit Maximalthermometern (Abb. 9) weisen aus, daß die Verlängerung der Zeitdauer bis zum Erreichen des gewünschten Betriebsdruckes mit dem Temperaturanstieg im Innenraum in direkter Relation steht. Nachdem das Gerät den erforderlichen Druck angezeigt hatte, wurden mit den Maximalthermometern, bei leerem Gerät, Temperaturen zwischen 96°C und 104°C gemessen; bei Beladung mit 1.000 g Metallinstrumenten lagen diese Werte zwischen 112°C und 118°C .

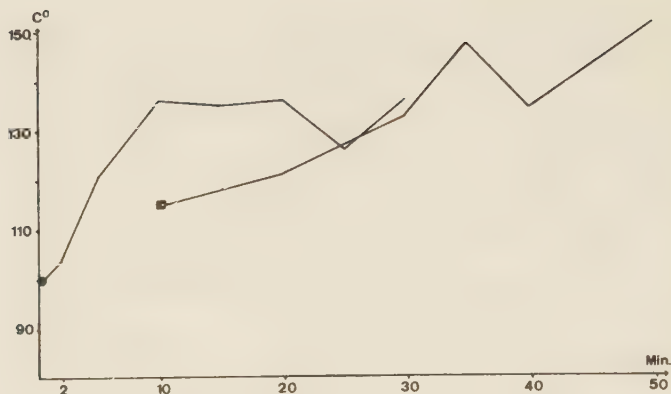


Abb. 9: Mittelwerte der Messungen der Temperatur mit zwei Maximalthermometern (hinten und vorne im Gerät) ohne Beschickung und mit Beschickung von 1.000 g metallischen Instrumenten bei je drei Testläufen.

- = Temperatur bei dem Zeitpunkt, an welchem bei leerem Gerät der gewünschte Betriebsdruck erreicht wurde.
- = Temperatur bei dem Zeitpunkt, an welchem bei beschicktem Gerät (1.000 g) der gewünschte Betriebsdruck erreicht wurde.

III. D I S K U S S I O N

Die Untersuchungen von ECKES (9) im Jahre 1955 hatten gezeigt, daß die Kombination von Hitze und gasförmigen Chemikalien auch ohne Wasserdampf zur Sterilisation geeignet ist. Als Hauptvorteil erwies sich die Verminderung einer Schädigung der Instrumente. WALKER (32) empfahl einen Gassterilisator, bei welchem er Sterilisation metallischer Geräte, insbesondere scharfer Instrumente und Handstücke durch eine alkoholische Lösung erreichte. Er berichtete über gute Ergebnisse von bakteriologischen Untersuchungen, es fehlen jedoch nähere Angaben der verwendeten Methodik. SNYDER (25) und Mitarbeiter sowie COUGHLIN und Mitarbeiter (8) beschrieben dagegen die Testverfahren genauer, sie setzten handelsübliche Präparationen von *Bac. stearothermophilus*-Sporen zur Bestimmung des Sterilisationseffektes ein und erzielten Sterilität 30 Minuten nach dem Erreichen des Betriebsdruckes. HABERMAN (14) untersuchte den Einfluß eines Alkohol-Aldehyd-Gasgemisches auf Sporen von *Bac. subtilis*, *Bac. stearothermophilus* und *Staph. aureus* und *E. coli*; weiter überprüfte er den Einfluß auf Influenza A₂ und Influenza B-Viren sowie LCM-Virus und Poliomyelitis-Virus Typ 2. Bei seinen Untersuchungen kam er zu dem Ergebnis, daß durch dieses Verfahren eine Abtötung dieser untersuchten Bakterienspezies

und Viren zu erreichen ist. Zusätzlich beschrieb er, daß durch dieses Verfahren im Vergleich zu Behandlung im Heißluftsterilisator oder Autoklaven eine weit geringere Schädigung von scharfen und feinmechanischen Instrumenten auftritt.

Der Vorteil einer geringeren Korrosion von Metallinstrumenten wurde auch von anderen Untersuchern (7, 13, 24) beschrieben. Weitere bakteriologische Untersuchungen wurden von MILLER und Mitarbeitern (16) unter Verwendung der vorher erwähnten Sterilisationslösung mit *Bac. subtilis variatio globigii* als Testkeim durchgeführt. Lediglich BLAKE (3) erzielte in seinen Experimenten keinen sicheren Sterilisationseffekt. Er kontaminierte zahnärztliche Metallinstrumente, Watterollen und Leinenstückchen mit *Staph. aureus*, Sporen von *Bac. stearothermophilus* und *Bac. subtilis*, suspendiert in Wasser und Serum, und exponierte die kontaminierten Materialien durch 10', 20' und 30'. Die Materialien, die mit den Sporenpräparationen in Serum kontaminiert wurden, waren auch nach einer Einwirkungszeit von 30' nicht steril. Seine Untersuchungsergebnisse werden durch unsere Versuche insofern bestätigt, als auch wir eine weit höhere Resistenz von Sporenpräparationen im Vergleich zu *Staph. aureus* beobachteten; ferner konnten wir keinen Sterilisationseffekt nach 30' Chargenzeit bei Verwendung einer großen Menge Sterilisiergutes erzielen.

Trotz dieser zahlreichen Untersuchungen, die teilweise während der Entwicklung des Verfahrens durchgeführt worden sind, fehlen genaue Untersuchungen über die Empfindlichkeit verschiedener Keimspezies. Es ist nämlich nicht erlaubt, generell von der weitgehend bekannten Thermostabilität auf die Chemoresistenz gegen Alkohol-Aldehyd-Präparate zu schließen.

Eine Prüfung der Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen gegen schädigende Noxen kann immer nur unter bestimmten Bedingungen, die wiederum die Resistenz beeinflussen können, durchgeführt werden. Aufgrund dieser Überlegungen ist die Resistenz von Mikroorganismen immer nur bei ein- und derselben Präparationsweise vergleichend, als relativ mit anderen Mikroorganismen festzulegen. Bei der von uns gewählten Präparationsweise entschieden wir uns, die Keime in CSL zu suspensieren, da derartige Suspensionen im angetrockneten Zustand zu besonders hohen Überlebensraten führen und dabei zusätzlich eine auch unter praktischen Verhältnissen vorkommende Belastung mit organischem Material simuliert wird. Durch die Verwendung von Batistklappchen als Keimträger in diesen Versuchen wurde für das Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch die Voraussetzung geschaffen, von beiden Seiten auf die angetrockneten Keime einwirken zu können. Am resistantesten erwiesen sich dabei die Sporen von Clostridien und Bazillen. Unter all den getesteten Sporen zeigten jedoch *Bac. subtilis variatio*

globigii ATCC 6633 und Clostridium perfringens die höchste Resistenz. Aufgrund der Ergebnisse bei den Subkulturen der Enterobakterien ist zu schließen, daß auch innerhalb der Keimspezies, wie z. B. bei Klebsiella, Resistenzunterschiede zwischen bestimmten Stämmen bestehen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Enterokokken gemacht. Diese relativ höhere Resistenz von Klebsiellen und Enterokokken gegenüber chemischen Einflüssen ist aus Versuchen mit Flächendesinfektionsmitteln (5) bekannt. Andererseits wiederum ist die geringe Resistenz der Pilze und Pilzsporen für die Einwirkung von Alkohol und Aldehyd (1, 29) spezifisch.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Resistenzen der verschiedenen getesteten Keime ist auf eine Kombination zwischen einem thermischen und chemischen Verfahren zurückzuschließen. Dabei ist zu beachten, daß bei der uns zur Verfügung stehenden Geräten eine Veränderung der Einwirkungszeit bei kurzen Zeiten mit einem Anstieg der Temperatur gekoppelt ist. Während bei den kurzen Zeiten (25 Sekunden und 45 Sekunden) vorwiegend der chemische Effekt in Erscheinung tritt, zeigt bei längeren, und damit bei höheren Temperaturen, der Vergleich der Resistenzen der verschiedenen Testkeime eine starke Ähnlichkeit mit den von KONRICH (19) aufgestellten vier Resistenzstufen. Jedoch unterschieden sich diese verschiedenen Resistenzen stark von denen, von WERNER und Mitarbeitern (34) beobachteten Resistenzstufen. Sie untersuchten die

Resistenzen verschiedener Mikroorganismen unter Einfluß von Äthylenoxid. Dabei fanden sie, daß *Staph. aureus*, Chlamydo-Sporen von *Candida albida albicans* und Sporen von *Bac. subtilis variatio globigii* ähnliche Resistenz aufwiesen. Wenn auch bei der Äthylenoxidsterilisation eine Temperatur von ca. 50° C notwendig ist, so stellt dennoch vorwiegend das Äthylenoxid die wirksame Komponente dar.

Diese Schlußfolgerung, daß der Sterilisationseffekt aufgrund einer chemischen und thermischen Kombination zustande kommt, wird auch durch die Beobachtung, daß die sehr thermoresistenten Sporen von *Bac. stearothermophilus* anscheinend durch die chemische Komponente stärker geschädigt werden, untermauert. *Bac. subtilis variatio globigii* zeigt auch bekanntermaßen gegenüber anderen chemischen Einflüssen eine höhere Resistenz, wohingegen *Bac. stearothermophilus* gegen chemische Einflüsse relativ empfindlich ist.

Von wesentlichem Einfluß auf die Resistenz der Mikroorganismen ist auch die Auswahl der Keimträger (Abb. 2). Die hohe Resistenz der Keimpräparationen auf Batistlappchen ist durch die stärkere Antrocknung der Keimsuspension auf Filter- und Glasträger jedoch durch den stärkeren Feuchtigkeitsgehalt auf Batistlappchen und damit geringere Angriffsmöglichkeit des Gasgemisches zu erklären. Werden die Mikroorganismen in Kochsalzlösung oder

Serum aufgebracht, so sind auf allen Keimträgern die Sporen von *Bac. subtilis variatio globigii* schwerer abzutöten. Wie auch bei anderen Sterilisationsverfahren wird also durch organische Hüllsubstanzen und Kristallbildungen um die Mikroorganismen die Keimabtötung erschwert. Aufgrund des Abfalls der Kurve bei Verwendung von Serum bei der Herstellung der Keimsuspension ist wahrscheinlich durch Verlängerung der Einwirkungszeit auch bei Batistlappchen und Glas ein Sterilisationseffekt zu erreichen. Die Ausbildung von Kristallen um die Keime bzw. Mikroorganismen scheint jedoch - wie der horizontale Verlauf der Abtötungskurve auf Batistlappchen bzw. Glas (Abb. 3) zeigt, einen Sterilisationseffekt zu verhindern.

Außer durch unterschiedliche Keimträger kann die Sterilisation durch unterschiedliche relative Feuchte bzw. einen hohen Wassergehalt des Sterilisiergutes ganz wesentlich beeinflusst werden. Wie Untersuchungen von ERNST und SHULL (10, 11) sowie GILBERT und Mitarbeiter (12) gezeigt haben, ist bei der Äthylenoxidsterilisation nicht nur die relative Feuchte während der Sterilisation, sondern darüber hinaus auch die vorherige Antrocknung bzw. die absolute Feuchte der Keime selbst von großem Einfluß auf den Sterilisationseffekt. Sie zeigten, daß vollständig getrocknete Sporen praktisch nicht immer mittels Äthylenoxid abgetötet werden können. Von gleicher Bedeutung ist die absolute Feuchte der Zellwand

auch bei der Sterilisation mit gasförmigem β -Propiolakton (15). Zum Unterschied davon ist bei der Sterilisation im Heißluftsterilisator eine Trocknung des Sterilisiergutes vor der Sterilisation notwendig; andernfalls muß die Chargenzeit verlängert werden, da durch die Trocknung eines feucht eingelegten Sterilisiergutes infolge Entzuges von Verdampfungswärme die Steige- und Ausgleichszeit verlängert werden.

Wie die Ergebnisse unserer Untersuchungen bei Antrocknung der Keimsuspension in Aqua dest. auf verschiedenen Keimträgern bei unterschiedlicher relativer Feuchte zeigen, wird auch dieses Verfahren durch den verbleibenden Feuchtigkeitsgehalt stark beeinflusst (Abb. 5a - 5c). Je höher die Restfeuchte ist, um so längere Einwirkungszeiten werden für die Abtötung der Sporen benötigt. Scheinbar wird durch einen Feuchtigkeitsmantel der Angriff des Alkohol-Aldehyd-Gasgemisches am Zell-Leib der Sporen erschwert bzw. durch den Wassergehalt die wirksame Konzentration des Wirkgases am Wirkungsort verringert. Auch bei diesen Experimenten war die Abtötung der Keime auf den Batistläppchen am schwierigsten. Die Zunahme der Resistenz der Sporenpräparationen mit steigender relativer Feuchte bei der Antrocknung ist auch bei Verwendung von Sporen in NaCl und physiologischer Kochsalzlösung festzustellen. Da auch hier die Resistenz bei vorheriger Antrocknung bei 98 % relativer Feuchte am höchsten ist, scheint

allein der Faktor der Umhüllung der Mikroorganismen in Kristallen nach diesen Ergebnissen nicht ausschlaggebend zu sein. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß das Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch durch einen hohen Flüssigkeitsgehalt mit Mineralsalzen noch mehr in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt wird, als ohne zusätzliche Mineralsalze. Auch aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß bei Kontamination der Keimträger mit Sporen, suspendiert in physiologischer Kochsalzlösung, diese Sporen auf Batistläppchen und Glas am schwierigsten abzutöten sind. Auch bei Antrocknung der Keimsuspensionen mit einem Endgehalt von 20 % Serum auf den verschiedenen Keimträgern zeigte sich eine Resistenzzunahme mit zunehmender relativer Feuchte bei der Antrocknung. Wie aus den Keimabtötungskurven der drei verschiedenen Keimträgern nach Antrocknung bei einer relativen Feuchte von 98 % (Abb. 7c) ersichtlich, kann ein hoher Gehalt an organischen Substanzen den Sterilisationseffekt erschweren, wenn nicht gar verhindern.

Die vergleichende Untersuchung der Eignung von Sporenerde und zweier handelsüblicher Sterilindikatoren zeigte, daß diese Sporenerdepräparation, die nach der DIN-Norm 58947 geforderte Thermoresistenz besitzt, zur Überprüfung des Sterilisationseffektes auch bei diesem Verfahren geeignet ist. Obwohl Sporen von *Bac. stearothermophilus* eine geringere Resistenz zeigten, ist auch die Präparationsweise, wie sie für die ATTEST-Indikatoren erfolgt, zur Prüfung des Sterilisationseffektes zulässig.

Da bei jedem für die Praxis geeigneten Sterilisationsverfahren die Möglichkeit einer Verpackung gegeben sein muß, die eine sichere Sterilisation gestattet und nach der Sterilisation weiterhin eine Kontamination verhindern muß, waren die Versuche, bei denen der Abtötungseffekt von *Bac. subtilis*-Sporen auf Keimträgern in unterschiedlicher Verpackung von ausschlaggebender Bedeutung. Die für diesen Zweck empfohlenen Papiertüten verlängern die notwendige Einwirkungszeit nur geringgradig, sind jedoch derartig gasdurchlässig, so daß sie eine sichere Sterilisation gewährleisten.

Wie die Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Mengen metallischer Instrumente als Sterilisiergut zeigen, wird die Zeitdauer bis zum Erreichen des gewünschten Betriebsdruckes dadurch ganz wesentlich beeinflußt. Parallel mit dem Anstieg des Druckes ist selbstverständlich ein Temperaturanstieg gegeben. Diese "Druckanstiegszeit" entspricht beim thermischen Sterilisationsverfahren der Steige- und Ausgleichszeit. Auch bei thermischen Sterilisationsverfahren wird durch die Menge des Sterilisiergutes die Steige- und Ausgleichszeit und damit die Chargenzeit verlängert. Aufgrund unserer Versuche beginnt die eigentliche Abtötungszeit erst ab dem Zeitpunkt, zu welchem ein Druck von 1,406 atü (= 20 lbs.) erreicht ist.

IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG DER STERILISATION MIT DEM ALKOHOL-ALDEHYD-GASGEMISCH

Mit diesem Verfahren dürfen nur metallische Instrumente, Materialien aus Glas sowie Filter sterilisiert werden. Von der Behandlung von Wäsche bzw. Leinen ist abzuraten. Vor der Sterilisation müssen die Materialien exakt gereinigt werden und für den letzten Spülgang sollte Aqua dest. oder zumindest Leitungswasser verwendet werden. Um eine sichere Sterilisation zu erreichen, ist die Trocknung vor der Verpackung in den empfohlenen Papiertüten vorzunehmen. Die Gesamtdauer der Sterilisation (= Chargenzeit) setzt sich zusammen aus der Druckanstiegszeit - das ist der Zeitraum vom Beschicken des Gerätes bis zum Erreichen des gewünschten Betriebsdruckes - und einer Abtötungszeit von 20 Minuten. Bei dieser Abtötungszeit ist ein ausreichender Sicherheitszuschlag miteingerechnet. Um die Chargenzeit niedrig zu halten, sollte das Gerät nur locker mit einer kleinen Menge Sterilisiergut beschickt werden. Für die Dauer der Druckanstiegszeit kann eine grobe Faustregel angewendet werden:

500 g Beschickungsgut	5 Minuten
1.000 g Beschickungsgut	10 Minuten
2.000 g Beschickungsgut	20 Minuten.

Unabhängig davon muß aber auch, wie bei jedem anderen Sterilisationsverfahren, regelmäßig der Sterilisationseffekt überprüft werden. Vor allem ist zu betonen, daß eine derartige Kontrolle auch bei jeder Änderung der Beschickungsart zu erfolgen hat. Die auf den von der

Herstellerfirma empfohlenen Papiertüten aufgedruckten Farbindikatoren sind jedoch nicht zur Überprüfung des Sterilisationseffektes geeignet und können nur als Hinweis dienen, ob das betreffende Material in den Tüten in dem Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch exponiert war. Für eine exakte Überprüfung des Sterilisationseffektes ist auch hier wie bei anderen Verfahren eine Kombination von physikalischen und biologischen Tests zu empfehlen. Einfach durchzuführen ist die Temperaturkontrolle mittels Maximalthermometer. Für die Selbstkontrolle empfiehlt es sich, da das Verfahren aus einer Kombination von chemischen und thermischen Einflüssen besteht, die Überprüfung der Abtötung von Sporen von *Bac. subtilis variatio globigii* und *Bac. stearothermophilus* zu untersuchen. Anstelle derartiger Sterilindikatoren können auch die nach der DIN-Norm 58947 hergestellten Sporenerdepäckchen verwendet werden.

Bei Beachtung all dieser Faktoren ist mit diesem neuen Sterilisationsverfahren eine sichere Sterilisation zu erreichen.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Bei der Sterilisation scharfer und feinmechanischer Instrumente mit gespanntem, gesättigtem Wasserdampf oder im Heißluftsterilisator treten Korrosionsschäden auf, und scharfe Instrumente werden rasch stumpf. Diese Schädigung ist nach den Literaturangaben weit geringer bei dem sogenannten HARVEY-Verfahren, bei welchem ein Alkohol-Aldehyd-Gasgemisch mit nur geringem Wassergehalt unter Druck eingesetzt wird.

In der vorliegenden Untersuchung wurde zuerst die Resistenz unterschiedlicher Keimspezies festgestellt. Dabei zeigte es sich, daß die Sporen von *Bac. subtilis variatio globigii* und *Clostridium perfringens* am resistantesten sind. Die zusätzlich durchgeführten Experimente zur Festlegung der Abtötungskurven auf verschiedenen Keimträgern und mit verschiedenen Hüllsubstanzen sowie bei verschiedener relativer Feuchte bei der Antrocknung ergaben, daß Keime angetrocknet auf Batistkläppchen sich am resistantesten zeigen. Darüber hinaus wird der Sterilisationseffekt durch Hüllsubstanzen wie Kochsalz und Serum stark beeinflußt. Werden die Keimträger vor der Sterilisation bei niedriger relativer Luftfeuchte getrocknet, so ist dieses Verfahren bei der anschließenden Sterilisation weit wirksamer als bei Vortrocknung bei hoher relativer Luftfeuchte. Für die praktische Durchführung des Sterilisationsverfahrens ist auch noch die bewiesene Diffusion des Alkohol-Aldehyd-

Gasgemisches durch Papier, welches als Verpackungsmaterial verwendet wird, bedeutsam.

In weiteren Versuchen wurde die Beeinflussung der Chargenzeit durch unterschiedliche Menge Sterilisiergutes getestet. Dabei zeigte es sich, daß durch zunehmende Mengen an Sterilisiergut die Dauer des Zeitraumes vom Beschicken des Sterilisators bis zum Erreichen des gewünschten Betriebsdruckes ganz wesentlich beeinflußt wird.

Abschließend werden Empfehlungen für die praktische Durchführung dieses Sterilisationsverfahren sowie für die Überprüfung des Sterilisationseffektes gegeben.

Identifikations- zahl	Testkeim	25	45	60	90	120	150	180	210	240	Kontrolle
1	Bac. subtilis ATCC 6051	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	+++
2	Bac. subtilis var. globigii ATCC 6633	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	+++
3	Bac. cereus ATCC 9139	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	+++
4	Bac. anthracis	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	+++
5	Bac. stearother- mophilus	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	+++
6	Cl. perfringens	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	+++

Tab. 1: Subkulturen der Bazillen von Clostridien-Sporen nach Exposition von je 3 Keimträgern in Alkohol-Aldehyd-Formalin-Gasgemisch bei unterschiedlichen Zeiten.

Identifikations- zahl	Testkeim	Einwirkungszeit in Sekunden			Kontrolle
		25	45	60	
7	Staph. aureus ATCC 6538 p	---	---	---	+++
8	Staph. aureus SG 511	+--	---	---	+++
9	Staph. aureus	+--	---	---	+++
10	Staph. aureus	---	---	---	+++
11	Staph. aureus	---	---	---	+++
12	Staph. epidermidis	---	---	---	+++
13	Ps. aeruginosa ATCC 15442	---	---	---	+++
14	Ps. aeruginosa	---	---	---	+++
15	Ps. aeruginosa	---	---	---	+++
16	Ps. aeruginosa	---	---	---	+++
17	E. coli ATCC 11229	---	---	---	+++
18	E. coli	---	---	---	+++
19	E. coli	---	---	---	+++
20	E. coli	---	---	---	+++
21	S. typhimurium	---	---	---	+++
22	Prot. mirabilis ATCC 14153	+--	---	---	+++
23	Prot. mirabilis	---	---	---	+++
24	Prot. vulgaris	---	---	---	+++
25	Prot. vulgaris	---	---	---	+++
26	Prot. vulgaris	---	---	---	+++

Identifikations- zahl	Testkeim	Einwirkungszeit in Sekunden			Kontrolle
		25	45	60	
27	Klebsiella pneumoniae	+-	---	---	+++
28	Klebsiella pneumoniae	+++	+++	---	+++
29	Klebsiella pneumoniae	---	---	---	+++
30	Listeria monocytogenes	---	---	---	+++
31	Strept. faecalis NTCC 8217	+++	---	---	+++
32	Strept. faecalis	+-	---	---	+++
33	Strept. faecalis	+++	---	---	+++
34	Strept. faecalis	---	---	---	+++
35	Microsporium gypseum	---	---	---	+++
36	Trichoph. metagrophytes	---	---	---	+++
37	Candida albicans ATCC 10231	---	---	---	+++
38	Candida albicans	---	---	---	+++
39	Chlamydosporen von Candida albicans	---	---	---	+++
40	Saccharomyces cerevisia	---	---	---	+++

Tab. 2: Ergebnisse der Subkulturen nach Exposition von je 3 Keimträgern in Alkohol-Aldehyd-Formalin-Gasgemisch bei unterschiedlichen Zeiten

Menge an metallischem Sterilisiergut	Getestete Gesamtdauer	davon Zeitdauer bis zum Erreichen des Betriebsdruckes	Wachstum in der Subkultur
0	5'	25" - 33"	+
	7,5'		+
	10'		-
500 g	10'	5'	+
1000 g	10'	10'	+
	20'		+
	22,5'		-
	25'		-
	27,5'		-
	30'		-
	35'		-
	40'		-
	50'		-
2000 g	30'	18'	+

Tab. 4: Abhängigkeit der zur Sterilisation nötigen Gesamtdauer von der Menge an metallischem Sterilisiergut.
+ = Wachstum von Bac. stearothermophilus
- = kein Wachstum von Bac. stearothermophilus

Biolog. Testmaterial	Subkultur- medium	Bebrütungs- temperatur	Nachweis	Einwirkungsdauer (Gesamtz.) in min								Kontrolle
Sporen- erde- päckchen	Thioglykolat- Bouillon	37°C	native Erd- sporen	2	3	4	5	6	7	8		+++
	CSL			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
ATTEST	CSL	56°C	Bac. stearo- thermo- philus	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	CSL			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
SPORDI	CSL	37°C	Bac. subtilis	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++
	CSL			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	CSL	56°C	Bac. stearo- thermo- philus	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++

Tab. 5: Ergebnisse der Subkulturen bei leerem Gerät

+ = Wachstum

- = kein Wachstum

CSL = Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALDER, V. G. und J. P. MITCHELL: Recent developments on the use of sub-atmospheric steam and formaldehyde gas at 80°C for the sterilisation of endoscopes
Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin,
Math.-Nat. R. 18, 1015 - 1018 (1969)
2. BEEBY, M. M. und C. E. WHITEHOUSE: Bacterial Spore Test Piece for the control of Ethylene Oxide Sterilization
J. appl. Bact. 28, 349 - 360 (1965)
3. BLAKE, G. C.: Tests of a Vapour Sterilizer and an Autoclave for Dental Instruments and Materials
Brit. D. J. 116, 491 - 498 (1969)
4. BORNEFF, J.: Aktuelle Fragen zur medizinischen Sterilisation
Mittlg. Österr. San.-Verw. 72, 154-156 (1971)
5. BRONEFF, J.: Persönliche Mitteilung
6. BRUHIN, H., X. BÜHLMANN und W. A. VISCHER: Möglichkeiten und Grenzen der Äthylenoxid-Sterilisation
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 208, 653-658 (1968)

7. BRUSKIN, R. H.: Asepsis and Sterilization in the Dental Office
Alpha Omegan. 57, 145 - 150 (1964)
8. COUGHLIN, J. W., G. J. CHRISTENSEN und N. M. LANGFORD:
Comparison of Dry Heat, Autoclave and Vapor Sterilizers
J. Tenn. S. Dent. Assn. 47, 350-355 (1967)
9. ECKES, H. F.: Sterilization of Dental Instruments
J. South. Calif. S. Dent. A. 23, 20-24 (1955)
10. ERNST, R. R. und J. J. SHULL: Ethylene Oxide Gaseous Sterilization. I. Concentration and Temperature Effects
Appl. Microbiol. 10, 337 - 341 (1962)
11. ERNST, R. R. und J. J. SHULL: Ethylene Oxide Gaseous Sterilization. II. Influence of Method of Humidification
Appl. Microbiol. 10, 342 - 344 (1962)
12. GILBERT, G. L., V. M. GAMBILL, D. R. SPINER, R. K. HOFFMAN und C. R. PHILLIPS: Effect of Moisture on Ethylene Oxide Sterilization
Appl. Microbiol. 12, 496 - 503 (1964)
13. GOLDMAN, H. M., S. P. FORREST, D. L. BYRD und R. E. McDONALD: Current Therapy in Dentistry, St. Louis,
The C. V. Mosby Company, 364 (1964)

14. HABERMAN, S.: Some Comparative Studies between a Chemical Vapor Sterilizer and a Conventional Steam Autoclave on Various Bacteria and Viruses
J. South. Calif. S. Dent. A. 30,
163 . 172 (1962)
15. HOFFMAN, R. K.: Effect of Bacterial Cell Moisture on the Sporicidal Activity of β -Propiolactone Vapor
Appl. Microbiol. 16, 641 - 644 (1968)
16. MILLER, J. N., F. M. DAVIS und J. E. ZIEGLER:
Evaluation of Vapor Sterilization
J. D. Res. 43, 748 - 749 (1964)
17. KAYSER, A. M.: Bakteriologische Kontrolle der Äthylenoxyd-Sterilisation
Mittlg. Österr. San.-Verw. 72, 164-165 (1971)
18. KRISTENSEN, H.: Ethylene oxide reistance of micro-organismus in dust compared with the resistance of Bacillus subtilis spores
Acta path. microbiol. scand. Sect. B 78,
298 - 304 (1970)
19. KONRICH, F.: Die bakterielle Keimtötung durch Wärme
Enke, Stuttgart, 1938
20. MADORE, C.: Sterilization dans in cabinet dentaine
J. Canad. Dent. A. 29, 427 - 435 (1963)

21. MAYR, G.: Chemie und Physik im Dienste der Sterilisation, Desinfektion und Entwesung
Mittlg. Österr. San.-Verw. 72, 147-152 (1971)
22. MILLER, J. N. und F. M. DAVIS: The Efficiency of the Harvey Vapor Sterilizer
J. Dent. Res. 43, 748 (1964)
23. PHILLIPS, C. R.: The sterilizing action of gaseous ethylene-oxide. II. Sterilization of contaminated objects with ethylene-oxide and related compounds: time, concentration and temperature relationships
Amer. J. Hyg. 50, 280 (1949)
24. PRICHARD, J. F.: Advanced Periodontal Disease: Surgical and Prosthetic Management
Philadelphia, W. B. Saunders Co., 180-181 (1965)
25. SNYDER, M. L., M. SLAWSON und R. B. PARKER:
Bacteriology for Dental Students - A Laboratory Manual,
Minneapolis, Burgess Publishing Company,
28 - 29 (1961)
26. STÄNDER, W.: Die Anforderungen der chirurgischen Stomatologie an die Entkeimungslehre
Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin, Math.-Nat. R. 18, 1183 - 1184 (1969)
27. STRUPPE, H. F.: Zum Einfluß von Schutzstoffen auf die Äthylenoxidsterilisation
Gsdw. u. Desinf. 62, 49 - 53 (1970)

28. STRUPPE, H. F.: Ist Sporenerde zur Funktionskontrolle von Äthylenoxid-Sterilisation geeignet?
Arch. Hyg. Bakt. 153, 326 - 331 (1969)
29. SYKES, G.: The Sporicidal Properties of Chemical Disinfectants
J. appl. Bact. 33, 147 - 156 (1970)
30. THOMAS, L. C. und D. B. LONGMORE: Ethylene oxide sterilization of surgical stores
Anaest. 26, 304 - 307 (1971)
31. VALES, A. C.: Sporen von *B. subtilis* als biologischer Indikator zur Prüfung von Äthylenoxyd-Sterilisatoren
Mittlg. Österr. San.-Verw. 72, 162 - 164 (1971)
32. WALKER, R. V.: Sterile Techniques in Everyday Practice
Dent. clin. No. Am., Philadelphia,
W. B. Saunders Co., 698 - 699 (1959)
33. WEMMER, H. und I. REISCH: Ein praktisches Desinfektionsverfahren für zahnärztliche Mund- und Winkelstücke
Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin, Math.-Nat. R. 18, 1185 - 1187 (1969)
34. WERNER, H.-P., H.-J. KLEIN und M. ROTTER: Die Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen gegen Äthylenoxyd
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 262 - 271 (1970)

Herrn Prof. Dr. J. BORNEFF möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine wertvollen Beratungen danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. H.-P. WERNER für die vielen Anregungen und fortlaufenden Ratschläge sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Am 9. August 1941 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Helmut Hirth und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Herrlinger, in Heilbronn am Neckar geboren. Da mein Vater im Krieg gefallen war, heiratete meine Mutter den Zahnarzt Dr. Hans Müller, der mich später adoptierte. Seitdem trage ich den Doppelnamen Müller-Hirth.

Im Anschluß an den Besuch der Volksschule in Neustadt/Weinstr. (1948 - 1952) war ich von 1952 - 1958 Schüler der Höheren Schule in Neustadt/Weinstraße. Nach einem begonnenen Musikstudium in Mannheim entschloß ich mich, das Abitur nachzuholen. Die Reifeprüfung für Nichtschüler legte ich im März 1965 an der Humboldt-Schule in Wiesbaden ab.

Im Sommersemester 1965 nahm ich das Studium der Zahnheilkunde an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf. Nach der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung 1967 und der Zahnärztlichen Vorprüfung 1970 habe ich am 8. Juni 1973 die Zahnärztliche Prüfung an der Johannes Gutenberg-Universität bestanden.

Seit dem 1. Juli 1973 bin ich als Wissenschaftlicher Assistent an der Zahnärztlich-chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten in Mainz angestellt.

Im September 1971 heiratete ich die Apothekerin Gisela Bohrer.

